



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 17 723 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
B 01 L 3/00
C 12 M 3/00
C 12 Q 1/02

②1 Aktenzeichen: 101 17 723.2
②2 Anmeldetag: 9. 4. 2001
④3 Offenlegungstag: 17. 10. 2002

DE 101 17 723 A 1

⑦1 Anmelder:
Evotec OAI AG, 22525 Hamburg, DE

⑦4 Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

⑦2 Erfinder:
Gradl, Gabriele, Dr., 13503 Berlin, DE; Tietgen,
Karen, 20259 Hamburg, DE; Weber, Dagmar, 22525
Hamburg, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:

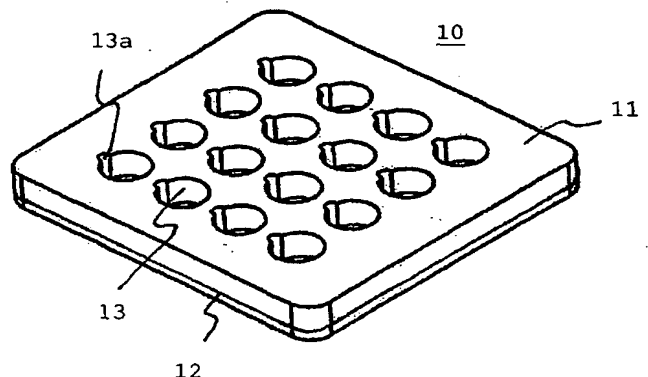
DE	33 33 674 C2
DE	198 53 640 A
DE	198 18 481 A1
US	56 43 742
US	54 87 872
US	54 62 874
US	50 26 649
EP	09 02 084 A2
EP	05 68 126 A1
EP	02 96 415 A2
WO	99 54 711 A1
WO	99 47 963 A1
WO	94 28 111 A1
WO	93 00 420 A1
WO	00 66 985 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Probenträger, insbesondere für biochemische Reaktionen

⑤7 Es wird ein Probenträger (10, 20) mit einer Vielzahl von Reservoirien (13) beschrieben, der aus einer Aufnahmeplatte (10) und einer Einsatzplatte (20) besteht, wobei die Aufnahmeplatte (10) zumindest teilweise aus einem optisch transparenten Material besteht und eine Vielzahl von Ausnehmungen zur Bildung der Reservoirie (13) aufweist und die Einsatzplatte (20) eine Vielzahl von Vorsprüngen (21) aufweist, die jeweils eine Membran (22) oder ein Plattenelement tragen und im zusammengesetzten Zustand des Trägers so in die Vertiefungen (13) der Aufnahmeplatte (10) hineinragen, dass die Membran (22) oder das Plattenelement jeweils in der Vertiefung (13) mit Abstand von deren Boden- und Seitenwänden angeordnet ist, wobei die Aufnahmeplatte (10) durch einen Verbund aus einer ebenen Lochplatte (11) und einer ebenen Bodenplatte (12) gebildet ist, die die Lochplatte (11) von einer Seite her verschließt und aus einem Material mit einer derartigen optischen Qualität und Planarität besteht, dass ein störungsfreier Durchtritt des Strahlengangs einer konfokal-optischen Messeinrichtung ermöglicht wird.



DE 101 17 723 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen Probenträger mit einer Vielzahl von Kompartimenten, die zur Aufnahme von Lösungen oder Suspensionen biologischer und/oder synthetischer Proben und zur Durchführung von Reaktionen, Messungen, Manipulationen oder dergleichen an den Proben eingerichtet sind. Die Erfindung betrifft insbesondere einen Zellkulturen-Träger mit Kultivierungskompartimenten, die zur Aufnahme und Kultivierung biologischer Zellen in flüssigen Medien eingerichtet sind. Die Erfindung betrifft auch Mess- und Manipulationsverfahren, die an Proben und/oder dem flüssigen Medium in den Kompartimenten durchgeführt werden.

[0002] In der modernen Wirkstoffforschung werden zunehmend Hochdurchsatztests (High-Throughput-Screening, HTS) verwendet, um die Wechselwirkung von verschiedenen Testsubstanzen mit Targetmolekülen, beispielsweise einem Enzym, zu untersuchen. Beim HTS werden eine Vielzahl von Testsubstanzen in getrennte Probenreservoirs eines Probenträgers eingebracht. Es erfolgt der Zusatz der Komponenten der Untersuchung, z. B. des Enzymtests, gegebenenfalls eine Inkubationsphase und schließlich die messtechnische Erfassung der Wechselwirkung der Testsubstanzen mit dem Enzym. Es erfolgt beispielsweise eine Fluoreszenzmessung in sämtlichen Probenreservoirs. Mit Blick auf hohe Durchsatzraten und einen geringen Substanzverbrauch besteht bei herkömmlichen HTS-Probenträgern ein Interesse, möglichst viele Probenreservoirs mit möglichst geringen Volumina auf einem gemeinsamen Träger anzuordnen.

[0003] In der unveröffentlichten deutschen Patentanmeldung DE 199 48 087 wird ein Probenträger beschrieben, der durch einen Verbund aus einer strukturierten Silikonmatte und einer Trägerplatte gebildet wird. Durch die Strukturierung der Silikonmatte werden die Probenreservoirs geformt. Der herkömmliche Probenträger ist zwar für HTS-Anwendungen geeignet und in Bezug auf die Miniaturisierbarkeit und Handhabbarkeit vorteilhaft. Es bestehen aber Nachteile in Bezug auf die eingeschränkte Anzahl durchführbarer Testverfahren (Testassays). Es bestehen insbesondere starke Beschränkungen bei der Kultivierung von Zellen und der Umsetzung von Testassays mit Zellen.

[0004] Aus EP 590 513 und EP 239 697 sind Einrichtungen zur Zellkultivierung bekannt, deren Aufbau aus einer Grundplatte 10' mit einer Vielzahl von Reservoirs 11' und Zellkultureinsätzen 20' schematisch in Fig. 10 gezeigt ist. Die Zellkultureinsätze 20' sind mit seitlichen Rändern 21' auf der Oberfläche der Grundplatte 10' eingehängt. Sie besitzen am Boden jeweils eine Membran, auf der adhären wachsende Zellen kultivierbar sind. Die Grundplatte 10' besteht aus einem transparenten Kunststoffmaterial, durch das im Bereich der Böden 12' optische Transmissionsmessungen durchgeführt werden.

[0005] Die dargestellte Kultivierungseinrichtung besitzt die folgenden Nachteile. Die Reservoirs 11' besitzen charakteristische Volumina im ml-Bereich. Es ergibt sich ein insbesondere für HTS-Anwendungen unannehmbar hoher Substanzverbrauch. Die Miniaturisierbarkeit der Einrichtung ist jedoch beschränkt. Die Zellkultureinsätze besitzen eine spezielle Geometrie, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Diese Geometrie erlaubt nicht eine skalierte Umsetzung in kleinere Dimensionen. Eine direkte Miniaturisierung der herkömmlichen Einrichtungen würde diese z. B. für Transportstudien untauglich machen, da der Abstand zwischen der Außenwand der Einsätze und der Innenwand der Reservoirs so gering wäre, dass ein Transfer von Flüssigkeiten zwischen benachbarten

Reservoirs durch Kapillarkräfte auftreten würde.

[0006] Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass die herkömmlichen Kultivierungseinrichtungen nur für einfache optische Transmissionsmessungen durch die transparente Grundplatte 10' geeignet sind. Die Grundplatte 10' aus Spritzguss-Kunststoff ergibt Probleme sowohl in Bezug auf die optische Qualität als auch in Bezug auf die Planarität. Optische konfokale Messverfahren, wie z. B. FCS-Verfahren (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie), insbesondere in Verbindung mit HTS, sind an den herkömmlichen Kultivierungseinrichtungen nicht durchführbar.

[0007] Wenn bei einem Test im Überstand der kultivierten Zellen gemessen werden soll, so muss die Membran, auf der die Kultivierung der Zellen erfolgt, relativ zum Boden der Grundplatte exakt positioniert sein. Nur wenn alle Membranen mit der gleichen Genauigkeit positioniert sind, werden die Konzentrationsverteilungen z. B. der von den Zellen in die Reservoirs sekretierten Produkte miteinander vergleichbar. Mit den oben beschriebenen, aus Kunststoff hergestellten Kultivierungseinrichtungen ist die exakte Positionierung der Membranen nicht zu gewährleisten. Eine Miniaturisierung wird dadurch weiter beschränkt. Bei einer Miniaturisierung würden durch das Dimensionsverhältnis des Materials der Trägerplatten zu den Reservoirs mechanische Verwerfungen auftreten, die zu einer uneinheitlichen Geometrie der Reservoirs führen würden.

[0008] Eine weitere Kultivierungseinrichtung (teilweise in schematischer Schnittansicht in Fig. 11 gezeigt) ist aus EP 902 084 bekannt. 24 Reservoirs 11' sind ähnlich wie bei einer Mikrotiterplatte in einer Grundplatte 10' aus Kunststoff angeordnet. Es ist eine Einsatzplatte 20' vorgesehen, die aus einer Vielzahl von lateral miteinander verbundenen Einsätzen besteht. Am Boden jedes Einsatzes ist eine Membran 22' zur Kultivierung der Zellen angeordnet. Dieser Aufbau ist zwar in Bezug auf die Gleichförmigkeit der Membranpositionierung günstiger als die oben beschriebenen Einrichtungen mit einzelnen Einsätzen. Allerdings besitzt er auch Nachteile hinsichtlich der Miniaturisierbarkeit und der Anwendung optisch-konfokaler Messverfahren. Eine ähnliche Anordnung mit Reservoirs, die zu einer gemeinsamen Einsatzplatte verbunden sind, ist auch aus US 4 828 386 bekannt.

[0009] Die Beschränkungen bei der Durchführung herkömmlicher Testverfahren gelten auch bei der Untersuchung synthetischer Proben. Analog zur Erfassung der Wechselwirkung biologischer Zellen mit Wirkstoffen kann eine biochemische Aufgabenstellung beispielsweise darin bestehen, die Wechselwirkung von synthetischen Oberflächenmodifizierten Partikeln (Beads) mit Wirkstoffen zu untersuchen.

[0010] Die Aufgabe der Erfindung ist es, einen verbesserten Probenträger anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Träger überwunden werden und der insbesondere einen erweiterten Anwendungsbereich in Bezug auf die am Träger durchführbaren Messverfahren besitzt und einen verringerten Substanzverbrauch ermöglicht. Der neue Probenträger soll insbesondere zur Durchführung von HTS-Verfahren geeignet sein. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, neue Anwendungen von Messverfahren mit Probenträgern bereitzustellen.

[0011] Diese Aufgabe wird durch einen Probenträger mit den Merkmalen gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Patentansprüchen.

[0012] Die Grundidee der Erfindung ist es, eine gattungsgemäße Probenträgereinrichtung mit einer Aufnahmeplatte (Grundplatte) und einer Einsatzplatte, die eine Vielzahl von Probeneinsätzen, insbesondere Kultivierungseinsätzen, auf-

weist, dahingehend weiterzuentwickeln, dass die Aufnahmeplatte als Verbund aus einer Lochplatte und einer Bodenplatte gebildet ist, wobei die Bodenplatte zum im Wesentlichen störungsfreien Durchtritt des Strahlengangs einer konfokal-optischen Messeinrichtung eingerichtet ist. Die Aufnahmeplatte besteht somit zumindest teilweise aus einem transparenten Material. Der Aufbau der Aufnahmeplatte aus zwei Komponenten besitzt mehrere Vorteile, die sich im Rahmen der genannten Aufgabe in Bezug sowohl auf die Miniaturisierbarkeit als auch auf die Durchführung erweiterter Messverfahren auswirken. Die Lochplatte kann mit hoher Genauigkeit hergestellt werden. Die völlig gleichartig herstellbaren Löcher der Lochplatte bilden die Reservoirs (Kompartimente) in der Aufnahmeplatte. Die Bodenplatte kann unabhängig von der Lochplatte mit der erforderlichen Planarität und optischen Qualität hergestellt werden. Das Merkmal des störungsfreien Durchtritts des Strahlengangs der konfokal-optischen Messeinrichtung charakterisiert die optische Qualität der Bodenplatte, die vorzugsweise aus Glas hergestellt ist. Das Material der Bodenplatte erlaubt einen im Wesentlichen störungsfreien Durchtritt der Strahlung, wenn das Material dafür geeignet ist, dass durch die Bodenplatte hindurch konfokal-optische Messungen durchgeführt werden.

[0013] Die Probeneinsätze sind als Vorsprünge der Einsatzplatte gebildet, die im zusammengesetzten Zustand der Aufnahme- und Einsatzplatten in die Reservoirs der Lochplatte hineinragen, so dass die an den freien Enden der Vorsprünge angeordneten Membranen (oder Plattenelemente) mit einem vorbestimmten Abstand von der inneren Oberfläche der Bodenplatte angeordnet sind. Die Probeneinsätze und die Dicke der Lochplatte sind vorzugsweise so bemessen, dass der Fokus einer konfokaloischen Messeinrichtung auf einer Membran oder in ihrer unmittelbaren Umgebung gebildet werden kann. Der Abstand der Membran von der Außenseite der Bodenplatte ist vorzugsweise mindestens so groß wie der Fokalabstand der Messeinrichtung, d. h. vorzugsweise im Bereich von 100 µm bis 2,5 mm, insbesondere 100 µm bis 1 mm. Falls auf der zur Bodenplatte abgewandten Seite der Membran gemessen werden soll, kann auch ein kleinerer Abstand der Membran von der Bodenplatte vorgesehen sein. Zur Erzielung dieser geometrischen Verhältnisse wird die Bodenplatte mit einer geringen Dicke ausgeführt, die vorzugsweise kleiner als 500 µm, besonders bevorzugt kleiner als 200 µm ist.

[0014] Der erfindungsgemäße Probenhalter ist für die Handhabung von biologischen und/oder synthetischen Proben geeignet. Besonders vorteilhaft ist die Anwendung des Probenhalters bei Aufnahme, Kultivierung, Vermessung und Manipulierung biologischer Zellen. Der Probenhalter wird dann auch als Zellkulturen-Träger bezeichnet. Mit diesem wird erstmalig die Möglichkeit geschaffen, in einer Kultivierungseinrichtung direkt an der Membran, die auch als Kultivierungsmembran bezeichnet wird, oder im Überstand Konfokalmessungen und insbesondere FCS-Messungen durchzuführen.

[0015] Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind durch die Bereitstellung von gegebenenfalls durchbrochenen, konus- oder streifenförmigen Vorsprüngen der Einsatzplatte, an denen jeweils die Membran angeordnet ist, Abstandshaltern und/oder Elektrodenanordnungen an den Kultivierungseinsätzen gekennzeichnet. Diese Merkmale ermöglichen besondere Anwendungen des Probenhalters, insbesondere als Zellkulturen-Träger, die im Einzelnen unten erläutert sind.

[0016] Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Der Probenhalter ist hochgradig miniaturisierbar, ohne dass die Trennung der Proben zwischen den Reservoirs oder die

Wirkstoffzufuhr zu den Proben, insbesondere Nährstoffversorgung der Zellen, eingeschränkt wird. Es sind konfokale optische Messungen sowohl an den Ober-(Innen-) oder Unter-(Außen-)Seiten der Membranen sowie anwendungsbahngängig in definiertem Abstand von den Membranen möglich. Im Träger sind Proben, insbesondere Zellen, einfach und störungsfrei kultivierbar. Die Zahl der pro Membran zu kultivierenden Zellen kann von rund 10^6 und höher, die bei herkömmlichen Systemen, z. B. gemäß Fig. 10 erforderlich sind, erfindungsgemäß auf rund 100 bis 5000 vermindert werden. Es ergeben sich Vorteile in Bezug auf die für einen Test benötigte Anzahl von Proben, z. B. von Zellen, sowie den Verbrauch an erforderlichen Assay- und Testsubstanzen. Wenn die Einsätze so bemessen sind, dass die Volumina ober- und unterhalb der Membranen im Wesentlichen gleich sind, ergeben sich z. B. für Transportstudien, bei denen der Transport einer Testsubstanz durch eine auf der Membran vorliegende konfluente Zellschicht verfolgt wird, Vorteile in Bezug auf den Substanzverbrauch und die Konzentration des in die Aufnahmeplatte transportierten Stoffes. Die Miniaturisierung und die Ähnlichkeit der Volumina ober- und unterhalb der Membran ist des Weiteren für Sekretionsassays mit biologischen Zellen besonders vorteilhaft. Bei diesen kann eine geringe Menge der Testsubstanz als Stimulus in die Kultivierungseinsätze auf die dort kultivierten Zellen appliziert werden. Die von den Zellen sekretierten Produkte werden in das vorgelegte Flüssigkeitsvolumen der Aufnahmeplatte abgegeben. Durch das geringe Volumen in der Aufnahmeplatte ist die Konzentration der sekretierten Stoffe schon nach kurzer Inkubationszeit ausreichend, um ein mit den hochempfindlichen optisch-konfokalen Messverfahren detektierbares Signal zu verursachen.

[0017] Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der Beschreibung der beigefügten Zeichnungen. Es zeigen:

[0018] Fig. 1, 2 schematische Perspektivansichten von Aufnahme- und Einsatzplatten erfindungsgemäßer Probenhalter;

[0019] Fig. 3 eine schematische Illustration der Probenhandhabung und Messung an erfindungsgemäßen Probenhalter;

[0020] Fig. 4 bis 9 schematische Schnittansichten verschiedener Ausführungsformen erfindungsgemäßer Probenhalter; und

[0021] Fig. 10, 11 Illustrationen herkömmlicher Kultivierungseinrichtungen (Stand der Technik).

[0022] Die Erfindung wird im folgenden am Beispiel eines ebenen Trägers beschrieben, bei dem 16 Probenreservoirs in geraden Reihen und Spalten angeordnet sind. Die Umsetzung der Erfindung ist jedoch nicht auf diese Anzahl von Reservoirs und diese Geometrie beschränkt, sondern auch mit wesentlich mehr Reservoirs mit beliebigen geometrischen Anordnungen und Formen möglich. Die Reservoirs werden vorzugsweise entsprechend der Probengeometrie von Mikro- oder Nanotiterplatten angeordnet, besonders bevorzugt sind Anordnungen aus $8 \cdot 12 = 96$ Reservoirs mit einem Reservoirabstand von 9 mm oder Anordnungen aus $12 \cdot 32 = 384$ Reservoirs mit einem Reservoirabstand von 4,5 mm vorgesehen.

[0023] Des Weiteren wird im Folgenden die Erfindung unter Bezug auf die Anwendung des erfindungsgemäßen Probenhalters als Zellkulturen-Träger mit Kultivierungsmembranen beschrieben. Die Anwendung des Probenhalters ist jedoch nicht auf biologische Proben beschränkt. In entsprechender Weise können auch synthetische Beads untersucht werden, von denen beispielsweise Moleküle abgespalten werden, deren Transport durch die Membran oder ein Plattenelement oder auch durch eine Zellschicht beobachtet

wird.

[0024] Die Fig. 1 und 2 illustrieren als Teile erfindungsgemäßer Probenträger in Perspektivansicht die Aufnahmeplatte 10 (Fig. 1) und die Einsatzplatte 20 (Fig. 2). Die Aufnahmeplatte 10 besteht aus einer Lochplatte 11 und einer Bodenplatte 12. In der Lochplatte 11 sind durchgehende Ausnehmungen oder Löcher 13 in Matrixanordnung ausgebildet. Die Ausnehmungen 13 bilden im zusammengesetzten Probenträger (siehe z. B. Fig. 3) die Reservoirs oder Kompartimente, in denen die Kultivierungseinsätze der Einsatzplatte 20 aufgenommen werden. Jede Ausnehmung ist mit einer seitlichen Ausbuchtung 13a versehen, die beim Einführen eines Kultivierungsmediums oder von für das Testsystem erforderlichen Assay-Komponenten als Führung für eine Pipettier- oder Dispensiervorrichtung dient.

[0025] Entsprechend zu den seitlichen Ausbuchtungen 13a der Aufnahmeplatte 10 können in der oberen Fläche der Einsatzplatte 20 jeweils am Rand der Vorsprünge 21 Durchtrittsöffnungen vorgesehen sein. Die Durchtrittsöffnungen (nicht dargestellt) sind so positioniert, dass im zusammengesetzten Zustand des Probenträgers eine durchgehende, vertikale oder leicht geneigte Verbindungsöffnung zum Inneren der Reservoirs gebildet wird. Diese Öffnung ermöglicht das Einsetzen der Pipettier- oder Dispensiervorrichtung in die Reservoirs im zusammengesetzten Zustand des Probenträgers und/oder die Einführung von Sensoren oder Elektroden. Die Ausbuchtungen 13a mit den (in Fig. 2 nicht illustrierten) Durchtrittsöffnungen können zur Anbringung weiterer Messeinrichtungen, insbesondere nach Durchführung einer Kultivierung, vorgesehen sein. In die Ausbuchtungen 13a können beispielsweise Kapillaren zur Durchführung einer Kapillarelektrophorese oder Elektroden zur Durchführung von Widerstandsmessungen eingesetzt werden.

[0026] Aus Widerstandsmessungen, die erfindungsgemäß erstmalig an miniaturisierten Systemen durchgeführt werden, kann auf den Konfluenzgrad einer Zellschicht rückgeschlossen werden. Ein relativ hoher Widerstand an der Membran bedeutet einen hohen Konfluenzgrad der Zellschicht. Die Ausbuchtungen 13a sind vorzugsweise sämtlich jeweils auf einer Seite der Ausnehmungen 13 angeordnet. Falls die Verwendung einer Pipette, einer Kapillare oder dergleichen nicht vorgesehen ist, kann auf die Ausbuchtungen 13a verzichtet werden.

[0027] Die Lochplatte 11 besteht vorzugsweise aus Kunststoff, z. B. Polycarbonat. Das Kunststoffmaterial kann anwendungsabhängig zumindest teilweise transparent oder nicht-transparent (licht- undurchlässig) sein. Die Lochplatte 11 kann mit einer Metallrahmung (nicht dargestellt) ausgestattet sein, die der Stabilisierung und Erhöhung der Planarität der Lochplatte und der Positionierung einerseits der Bodenplatte 12 und andererseits der Einsatzplatte 20 dient. Die Dicke der Lochplatte beträgt beispielsweise 1 bis 5 mm. Alternativ kann die Lochplatte 11 auch aus anderen Kunststoffen, z. B. Polypropylen oder Polystyrol bestehen.

[0028] Alternativ können die Lochplatte 11 und/oder die Einsatzplatte 20 mehrkomponentig aufgebaut sein. Im Kunststoffmaterial ist ein plattenförmiger Kern mit den jeweiligen Ausnehmungen vorgesehen. Der Kern besteht aus einem relativ zum Kunststoff höher schmelzenden Material, vorzugsweise Metall. Durch den mehrkomponentigen Aufbau kann die Planarität der Teile erhöht werden. Außerdem werden Verformungen des Probenträgers bei Wärmebehandlungen (z. B. Thermostatierungen) vermieden.

[0029] Die Bodenplatte 12 besteht vorzugsweise aus Glas. Es wird beispielsweise ein Deckglas mit einer Dicke im Bereich von 150 µm bis 200 µm, z. B. 170 µm, und einer Dik-
 65

lichkeitsgründen mit einer überhöhten Dicke eingezeichnet. Die Verwendung von Glas als Bodenplatte besitzt den zusätzlichen Vorteil, dass in der Glasplatte ausgeprägte Lichtreflexe gebildet werden können, die zur Autofokus-Einstellung des Mikroskops verwendet werden können.

[0030] Die Loch- und Bodenplatten 11, 12 werden miteinander adhärent verbunden. Dies erfolgt beispielsweise unter Verwendung eines inerten Klebstoffs oder einer inhärenten Haftfähigkeit der Lochplatte 11.

[0031] Die Einsatzplatte 20 bildet ein zur Aufnahmeplatte 10 komplementäres Gegenstück mit einer Vielzahl von Vorsprüngen 21, die entsprechend der Matrixanordnung der Ausnehmungen 13 ausgerichtet sind. In Fig. 2 ist die im zusammengesetzten Zustand des Probenträgers zur Aufnahmeplatte 10 hin weisende Seite der Einsatzplatte 20 dargestellt. Jeder Vorsprung 21 trägt an seinem freien Ende eine Membran 22. Die Membran ist eben (siehe Fig. 4 bis 7, 9) oder gekrümmt (siehe Fig. 8) ausgebildet und im Wesentlichen parallel zu den Ebenen der Aufnahme- und Einsatzplatten 10, 20 ausgerichtet. Unter im wesentlichen paralleler Ausrichtung wird hier verstanden, dass die Ebene der Membran anwendungsabhängig parallel oder auch gegenüber der Bodenplatte geringfügig verkippt oder eine in sich gekrümmte Membran relativ zur Bodenplatte so angeordnet ist, dass eine horizontale oder parallele oder geringfügig verkippte Orientierung des gekrümmten Bauteils gegeben ist. Die Einsatzplatte 20 besitzt einen äußeren Rahmen 23, der der Ausrichtung relativ zur Aufnahmeplatte 10 und der Handhabung der Einsatzplatte 20 dient. Die Einsatzplatte 20 besteht wie die Lochplatte 11 aus einem Kunststoffmaterial, sie wird im Spritzgussverfahren hergestellt.

[0032] In Fig. 3 ist ein erfindungsgemäßer Probenträger beispielhaft im Einsatz gezeigt. Der Probenträger liegt in einem Messplatz 30 auf einer Halterung 31, die vorzugsweise in allen Raumrichtungen verfahrbar ist und die Bodenseite des Trägers frei lässt. Mit einer Flüssigkeit-Fördereinrichtung 32 (z. B. Pipette, Dispenser oder dergleichen) werden die Reservoirs 13 des Probenträgers mit einem oder verschiedenen Kultivierungsmedien oder mit Assaykomponenten bzw. Testsubstanzen beschickt. Die Flüssigkeitsfördereinrichtung 32 kann auch zur Beschickung der Reservoirs der Aufnahmeplatte durch die oben beschriebenen Durchtrittsöffnungen und Ausbuchtungen 13a dienen. Es ist ein Konfokalmikroskop 33 vorgesehen, das so angeordnet ist, dass sein Strahlengang durch die Bodenplatte 12 in das Innere der Reservoirs 13 gerichtet ist. Schließlich kann noch eine weitere Beobachtungseinrichtung 34 für optische Transmissions- oder Fluoreszenzmessungen vorgesehen sein, die wie dargestellt von der Oberseite oder alternativ auch von der Bodenseite her angeordnet sein kann. Am Messplatz 30 kann ferner eine Einrichtung zur optischen Manipulation von Partikeln in den Reservoirs mit optischen Käfigen (Laser tweezer, optische Pinzette) vorgesehen sein.

[0033] Für Konfokalmessungen wie z. B. FCS-Messungen werden vorzugsweise die folgenden Messanordnungen verwendet. In einer Grundform ist das Mikroskop 33 mit einem Immersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur (stark fokussierend, lichtstark) ausgestattet. Es erfolgt die Messung unter Verwendung von Immersionsflüssigkeit von unten durch die Bodenplatte 12. Der Arbeitsabstand zwischen dem Objektiv und dem Fokus ist vorzugsweise kleiner als 1 mm, typischerweise im Bereich von 300 bis 400 µm. Von der Innenseite der Bodenplatte 12 bis zum Fokus ergibt sich ein freier Abstand von rund 150 µm. Dies ermöglicht vorteilhafterweise eine direkte Messung an Zellen, die auf der Unterseite der Membran nahe der Bodenplatte angeordnet sind, oder in einem definierten Abstand zwi-

schen Zellschicht und Bodenplatte. Fig. 6 zeigt zwei Beispiele von Einsätzen, bei denen die Zellen auf der Unterseite der Membran angeordnet sind. Die Kultivierung auf der Unterseite erfolgt vorzugsweise vor der eigentlichen Probenbehandlung, indem die Einsatzplatte 20 in umgekehrter Ausrichtung als Kultivierungsträger verwendet wird. In einer abgewandelten Anordnung erfolgt die Messung von oben ebenfalls mit einem Immersionsobjektiv, wobei die Einsatzplatte 20 mit einem Deckglas abgedeckt ist. In diesem Fall sind besondere Vorkehrungen zur hochgradig parallelen Ausrichtung des Deckglases relativ zur Ebene des Trägers zu treffen. Schließlich kann die Messung alternativ auch von oben ohne ein Deckglas und ohne Immersionsflüssigkeit erfolgen. Weitere Messvorgänge und Testansätze (Assays) werden beispielhaft unten erläutert.

[0034] In den Fig. 4 bis 9 sind verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Probenträger illustriert, die sich insbesondere in Bezug auf die Gestaltung der Einsatzplatten unterscheiden. Einander entsprechende Komponenten sind in den Figuren mit identischen Bezugszeichen versehen.

[0035] Fig. 4 illustriert eine Grundform des Trägers mit der Aufnahmeplatte 10, bestehend aus der Lochplatte 11 und der Bodenplatte 12, und der Einsatzplatte 20 mit den Vorsprüngen 21. Die zylinderförmigen Ausnehmungen 13, 13b, c der Lochplatte 11 bilden die Reservoirs, die mit einem Kultivierungsmedium oder einem Testmedium gefüllt sind (der Flüssigkeitsspiegel ist gestrichelt eingezeichnet). Die Vorsprünge 21 besitzen die Form eines Konus oder Kegelstumpfes mit einem sich zum freien Ende der Vorsprünge verjüngenden Querschnitt. An den Enden der Vorsprünge 21 ist jeweils eine Membran 22 angeordnet. Die Membranen bestehen aus den an sich für die Herstellung von porösen Membranen bekannten Materialien, wie z. B. Polycarbonat, und sind an den Enden der Vorsprüngen 21 angeschweißt. Der Durchmesser der Membranen liegt vorzugsweise im Bereich von 10 µm bis 1 mm. Die Membranen besitzen vorzugsweise Porengrößen im Bereich von 0,3 µm bis 20 µm. Die Zellen 40 können auf einer oder beiden Seiten der Membranen 22 kultiviert sein. Anwendungsabhängig können die Membranen auch durch FCS-taugliche Plattenelemente ersetzt werden.

[0036] Bei der in Fig. 5 gezeigten Ausführungsform der Erfindung sind zwischen der Einsatzplatte 20 und der Lochplatte 11 Abstandshalter 24 vorgesehen. Die Abstandshalter 24 sind als integraler Bestandteil der Einsatzplatte 20 auf deren Unterseite oder alternativ auch der Oberseite der Lochplatte 11 angebracht. Sie besitzen eine Dicke von rund 100 bis 1000 µm, z. B. 200 µm. Die Aufgabe der Abstandshalter 24 ist es, ein Wandern des Testmediums zwischen den Reservoirs unter Wirkung von Kapillarkräften zu unterbinden. Die Abstandshalter 24 werden bevorzugt insbesondere bei stark miniaturisierten Ausführungsformen der Erfindung angebracht. Eine weitere Funktion der Abstandshalter 24 kann darin bestehen, den Abstand der Membranen 22 von der Innenseite der Bodenplatte 12 und damit den Arbeitsabstand des Konfokalmikroskops einzustellen. Der Abstand der Unterseite der Membranen 22 (oder entsprechender Plattenelemente) von der Außenseite der Bodenplatte 12 liegt z. B. im Bereich von 0,1 bis 2,5 mm und beträgt vorzugsweise weniger als 1 mm.

[0037] Die Abstandshalter können auch der vereinfachten Kultivierung von Zellen in der Einsatzplatte dienen. Hierzu kann die Einsatzplatte nach dem Animpfen mit Zellen in einem Behälter mit Medium positioniert werden. Die Abstandshalter stellen sicher, dass die Membranen nicht auf dem Boden des Behälters aufliegen und die Nährstoffe des Mediums ungehindert auch durch die Membranen auf die Unterseite der Vorsprünge diffundieren können.

[0038] Ein Kriechen des Mediums zwischen den Reservoirs wird auch bei der Gestaltung gemäß Fig. 6 vermieden. Die Lochplatte 11 ist so geformt, dass an den von der Bodenplatte 12 abgewandten Seiten der Ausnehmungen 13 kegelförmige Ausschnitte 14 gebildet werden. Die Neigung der Ausschnitte 14 relativ zur Bodenplatte 12 ist geringer als die Neigung der konusförmigen Vorsprünge 21. Des Weiteren ist der senkrechte Abstand der Auflagepunkte 15 der Vorsprünge auf der Lochplatte 11 von der Grundfläche 16 der Einsatzplatte 20 größer als der senkrechte Abstand der Auflagepunkte 15 von der Oberseite der Lochplatte 11. Dadurch wird wie mit den Abstandshaltern 24 zwischen der Lochplatte 11 und der Einsatzplatte 20 eine Lücke gebildet, die ein Wandern des Kultivierungsmediums verhindert.

[0039] Die Vorsprünge 21 können, wie in Fig. 7 gezeigt ist, an ihren konusförmig geeigneten Seitenflächen Durchtrittsöffnungen 25 aufweisen, die die Flüssigkeitsbewegung in den Reservoirs 13 und insbesondere die Überführung von sekretierten Stoffen von der Innen- zur Außenseite der Vorsprünge 21 fördern. In diesem Fall können die porösen Membranen 22 auch durch undurchlässige Plattenelemente ersetzt werden. Anstelle der Membranen können beispielsweise Glasplatten geringer Dicke vorgesehen sein, die wie die Bodenplatte 12 Konfokalmessungen, wie z. B. FCS-Messungen ermöglichen. Die Durchtrittsöffnungen 25 können abweichend von der Darstellung auch im größeren Abstand von der Membran in einem oberen Bereich der Vorsprünge 21 vorgesehen sein. Die Durchtrittsöffnungen 25 können auch der Durchführung von Pipettenspitzen, Elektroden oder dergleichen dienen.

[0040] Auch die in Fig. 8 dargestellte Ausführungsform ermöglicht einen Transport von sekretierten Stoffen auf die Unterseite der hier gekrümmt ausgeführten Membranen 26, die entsprechend durch undurchlässige sphärisch gekrümmte Plattenelemente ersetzt sein können. Die sphärisch gekrümmten Membranen oder Plattenelemente sind parallel zur Bodenplatte ausgerichtet. Dies bedeutet, dass die gekrümmten Elemente eine im Wesentlichen horizontal ausgerichtete Aufnahme bilden. Bei dieser Gestaltung sind die Vorsprünge 21 als von der Grundfläche 16 der Einsatzplatte 20 in die Ausnehmungen 13 ragende Streifen gebildet, an deren Enden die Elemente 26 angebracht sind.

[0041] Zur Kombination von optischen mit elektrischen Messungen kann erfindungsgemäß vorgesehen sein, dass einzelne oder mehrere Ausnehmungen 13 der Lochplatte 11 und/oder einzelne oder mehrere Vorsprünge 21 mit Elektrodeneinrichtungen 50 ausgestattet sind (siehe Fig. 9). Die Elektrodeneinrichtungen 50 umfassen insbesondere streifenförmige Mikroelektroden 51, die zur Beaufschlagung mit Manipulations- und/oder Messspannungen mit einer nicht dargestellten Steuereinrichtung verbunden sind. Die Durchführung elektrischer Messungen an Zellen, Zellbestandteilen oder Makromolekülen ist an sich aus der Mikrosystemtechnik bekannt und wird daher hier im Einzelnen nicht beschrieben. Die Mikroelektroden 51 bestehen aus Metall oder Halbleitern. Es können auch Mikroelektroden 51 aus transparenten Schichtmaterialien (z. B. ITO) vorgesehen sein.

[0042] Im Folgenden werden Testverfahren (Assays) genannt, die zwar an sich aus dem Stand der Technik bekannt sind, mit besonderen Vorteilen jedoch mit dem erfindungsgemäßen Probenträger implementiert werden können.

1. HTS-Transportstudien von pharmazeutischen Wirkstoffen

[0043] Zur Untersuchung des Transports von Wirkstoffen durch eine Zellschicht (z. B. Epithel- oder Endothelzellen) wird eine Monoschicht der Zellen auf der Unter- oder Ober-

seite der Membran 22 erzeugt und der Wirkstoff in die obere Kammer 13b (siehe Fig. 4) gegeben. Zum Nachweis des Wirkstoffs in der unteren Kammer 13c wird ein biologisches Assaysystem (z. B. Antikörper, ein spezifisches Enzym oder dergleichen) in das Kultivierungsmedium gegeben und dessen charakteristische Fluoreszenz selektiv und mit hoher Empfindlichkeit mit dem FCS-Verfahren detektiert. Bei dieser Anwendung zeigt sich ein wichtiger Vorteil der Erfindung. Mit dem FCS-tauglichen Probenträger können erstmalig Kinetiken des Wirkstofftransports durch Zellschichten aufgenommen und ausgewertet werden, da die Messung direkt im Zellkulturen-Träger erfolgt.

2. Transmigrations-Assays

[0044] Gegenstand von Transmigrations-Assays ist die Untersuchung des Transports von Zellen durch Zellschichten (z. B. von Leukozyten durch Endothelzellen) und seiner Abhängigkeit von zusätzlichen Wirksubstanzen. Ziel der Tests ist beispielsweise die Suche nach Wirksubstanzen, die den Durchtritt der Zellen durch die Zellschichten unterbinden, was beispielsweise bei Entzündungsprozessen von Bedeutung ist. Für diesen Assay werden vorzugsweise Membranen mit Membranporen verwendet, deren Durchmesser größer als 2 µm, z. B. 3 µm, ist. Auf der Membranen (mit Bezugszeichen 40 in Fig. 4) wird eine Zellschicht kultiviert. In die obere Kammer 13b der Ausnehmung 13 werden die zu untersuchende Substanz und die Zellen, deren Durchtritt erfasst werden soll, in das Kultivierungsmedium gegeben. Die Zellen (z. B. Leukozyten) sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die in der unteren Kammer eintreffenden Zellen werden z. B. mit dem FCS-Verfahren detektiert. Wiederum ergibt sich als besonderer Vorteil die Möglichkeit der Aufnahme von Kinetiken.

3. Sekretions-Assays

[0045] Bei der Untersuchung von Sekretionsprodukten von Zellen nach Induktion durch einen Wirkstoff werden die basolaterale Sekretion und die apikale Sekretion unterschieden. Im ersten Fall werden Zellen auf der Oberseite der Membranen kultiviert und dem von oben zugegebenen Wirkstoff ausgesetzt. Für diese Anwendung sind insbesondere die Ausführungsformen gemäß den Fig. 7 und 8 geeignet. Zum Nachweis des Sekretionsprodukts in der unteren Kammer wird wiederum ein biologisches Assaysystem (z. B. Antikörper oder ein spezifisches Enzym) in das Kultivierungsmedium gegeben und dessen charakteristische Fluoreszenz z. B. mit dem FCS-Verfahren detektiert. Im zweiten Fall erfolgt die Kultivierung auf der Unterseite der Membranen.

4. Parakrine Sekretions-Assays

[0046] Bei diesem Assay wird ein durch einen Wirkstoff induziertes Sekretionsprodukt eines Zelltyps durch einen in einem definierten Abstand angeordneten zweiten Zelltyp aufgenommen, der auf das Sekretionsprodukt mit einem charakteristischen Signal (Fluoreszenzsignal) reagiert. Es sind beispielsweise Kultivierungen des ersten Zelltyps auf der Oberseite der Membran und des zweiten Zelltyps auf der Innenseite der Bodenplatte 12 oder des ersten Zelltyps auf der Oberseite und des zweiten Zelltyps auf der Unterseite der Membran vorgesehen.

[0047] Die in der vorstehenden Beschreibung, den Zeichnungen und den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren ver-

schiedenen Ausgestaltung den von Bedeutung sein.

Patentansprüche

1. Probenträger (10, 20) mit einer Vielzahl von Reservoiren (13), der aus einer Aufnahmeplatte (10) und einer Einsatzplatte (20) besteht, wobei die Aufnahmeplatte (10) zumindest teilweise aus einem optisch transparenten Material besteht und eine Vielzahl von Ausnehmungen zur Bildung der Reservoire (13) aufweist und die Einsatzplatte (20) eine Vielzahl von Vorsprüngen (21) aufweist, die jeweils eine Membran (22) oder ein Plattenelement tragen und im zusammengesetzten Zustand des Trägers so in die Vertiefungen (13) der Aufnahmeplatte (10) hineinragen, dass die Membran (22) oder das Plattenelement jeweils in der Vertiefung (13) mit Abstand von deren Boden- und Seitenwänden angeordnet ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aufnahmeplatte (10) durch einen Verbund aus einer ebenen Lochplatte (11) und einer ebenen Bodenplatte (12) gebildet wird, die die Lochplatte (11) von einer Seite her verschließt und aus einem Material mit einer derartigen optischen Qualität und Planarität besteht, dass ein störungsfreier Durchtritt des Strahlengangs einer konfokal-optischen Messeinrichtung ermöglicht wird.
2. Probenträger gemäß Anspruch 1, bei dem die Aufnahme- und Einsatzplatten (10, 20) so bemessen sind, dass auf der Membran (22) oder dem Plattenelement oder in deren unmittelbarer Umgebung ein Fokus einer konfokal-optischen Messeinrichtung gebildet werden kann.
3. Probenträger gemäß Anspruch 2, bei dem die Membran (22) oder das Plattenelement in einem senkrechten Abstand von der Außenseite der Bodenplatte (12) angeordnet ist, der im Bereich von 100 µm bis 2,5 mm, vorzugsweise kleiner 1 mm liegt.
4. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Dicke der Bodenplatte (12) geringer als 500 µm, vorzugsweise geringer als 200 µm, ist.
5. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, ~~bei dem die~~ **bei dem die** Dickeninhomogenität der Bodenplatte ~~geringer als 20%, vorzugsweise geringer als 10%, ist.~~
6. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem jeder Vorsprung (21) der Einsatzplatte die Form eines sich von der Ebene der Einsatzplatte zum freien Ende des Vorsprungs verjüngenden Konus besitzt, wobei am Ende des Vorsprungs die Membran (22) angeordnet ist.
7. Probenträger gemäß Anspruch 6, bei dem in der Wand der konusförmigen Vorsprünge seitliche Austrittsöffnungen (25) vorgesehen sind.
8. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5, bei dem jeder Vorsprung (21) der Einsatzplatte die Form eines von der Ebene der Einsatzplatte abstehenden, in die jeweilige Vertiefung ragenden Streifens besitzt, an dessen Ende die Membran (26) angeordnet ist.
9. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem jede Vertiefung (13) die Form eines geraden Kreiszylinders besitzt, an dessen freiem, zur Bodenplatte entgegengesetzten Rand jeweils eine Ausbuchtung (13a) zur zeitweiligen Positionierung und Ausrichtung von Manipulations- oder Messeinrichtungen vorgesehen ist.
10. Probenträger gemäß Anspruch 9, bei dem die Einsatzplatte (20) Durchtrittsöffnungen aufweist, die im

zusammengesetzten Zustand der Aufnahme- und Einsatzplatten (10, 20) freie Verbindungen mit den Ausbuchtungen (13a) bilden.

11. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem zwischen der Bodenplatte (12) 5 und der Einsatzplatte (20) eine Abstandshaltereinrichtung (24) vorgesehen ist, mit der der Abstand der Membran (22) oder dem Plattenelement von der Bodenplatte (12) festgelegt ist.

12. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem jede Vertiefung (13) die Form eines geraden Kreiszylinders besitzt, an dessen freien, zur Bodenplatte entgegengesetzten Rand jeweils ein Ausschnitt (14) zur Bildung eines Abstandes zwischen der Lochplatte (11) und der Einsatzplatte (20) vorgesehen 15 ist.

13. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei denen die Vorsprünge (21) und/oder die Innenwände der Reservoirs (13) mit einer Elektroden- 20 einrichtung (50) ausgestattet sind.

14. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei denen die Reservoirs (13) entsprechend dem Format von Mikro- oder Nanotiterplatten angeordnet sind, wobei vorzugsweise Anordnungen aus 96 oder 384 Reservoirs vorgesehen sind. 25

15. Probenträger gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, der einen Zellkulturen-Träger bildet.

16. Verfahren zur Untersuchung von Zellen, Zellbestandteilen oder suspendierten oder gelösten Stoffen in den Reservoirs eines Probenträgers gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei denen eine konfokal- 30 mikroskopische Untersuchung, vorzugsweise eine FCS-Messung, durchgeführt werden.

17. Verwendung eines Probenträgers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, für HTS-Transportstudien von pharmazeutischen Wirkstoffen, Transmigrations-Assays, Sekretions-Assays und/oder parakrine Sekretions-Assays und/oder Studien zur Wechselwirkung synthetischer Probenpartikel mit synthetischen und/oder biologischen Testsubstanzen. 40

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

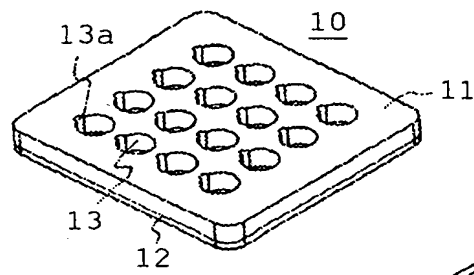


Fig. 1

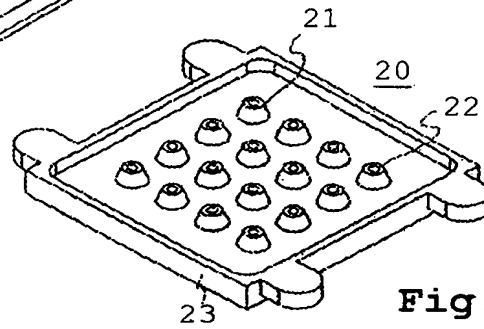


Fig. 2

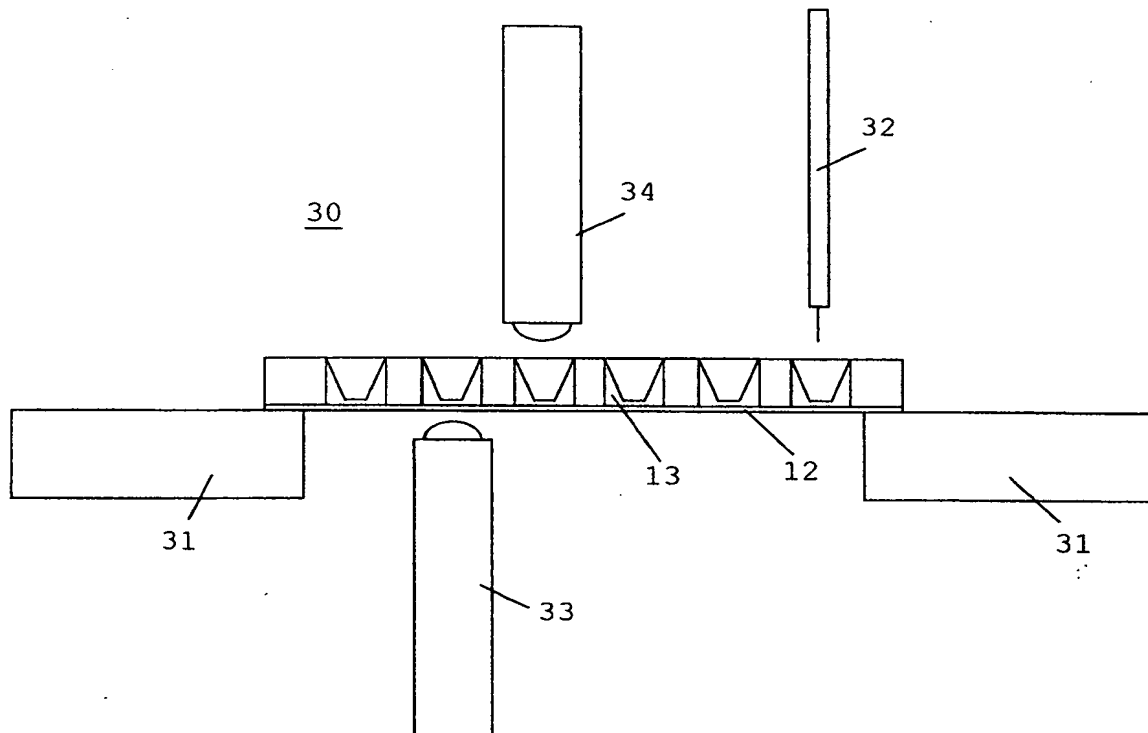


Fig. 3

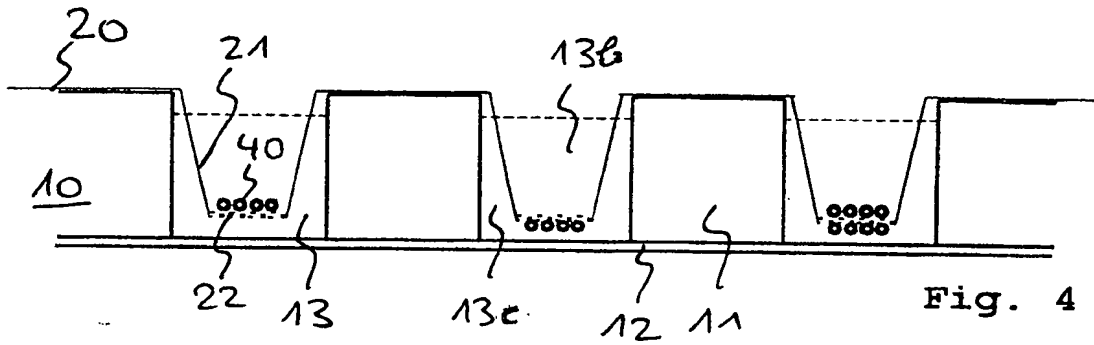


Fig. 4

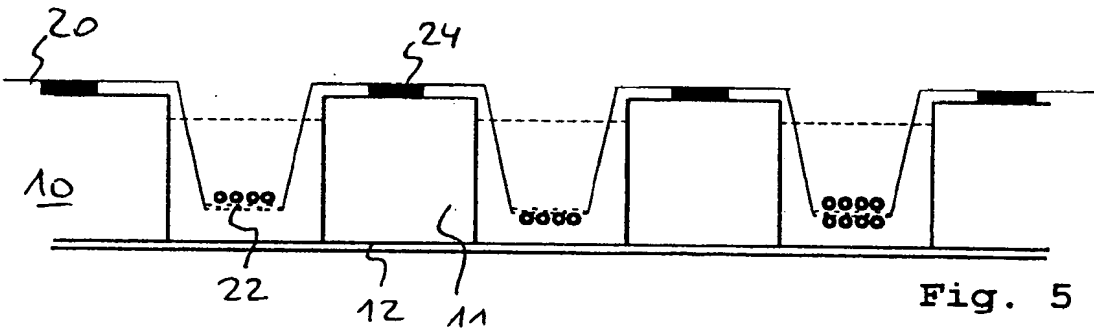


Fig. 5

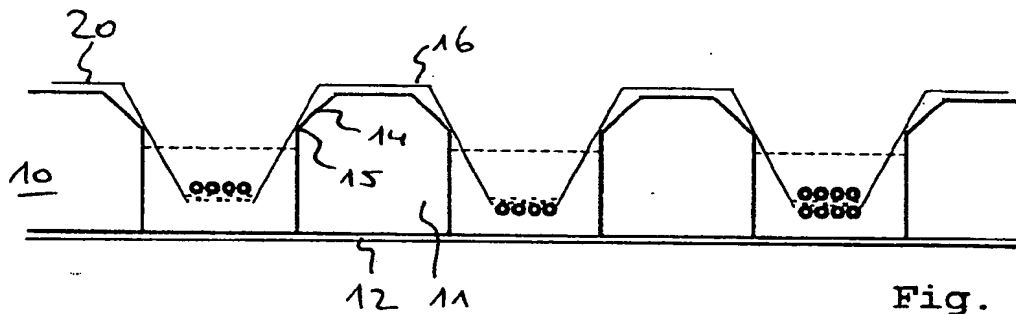


Fig. 6

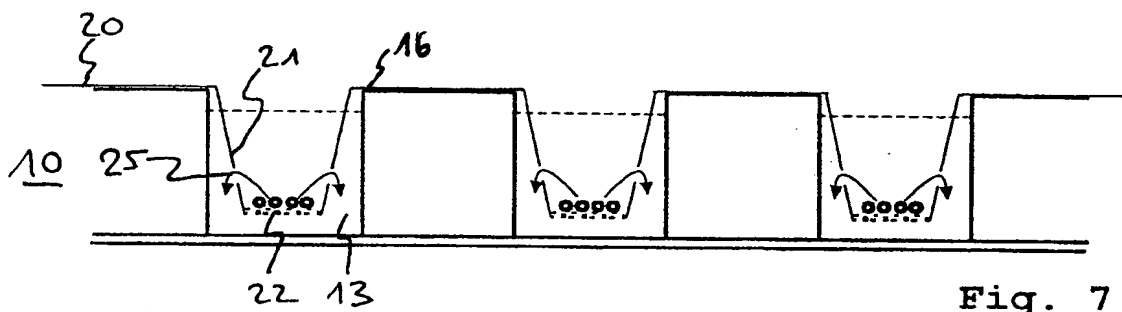


Fig. 7

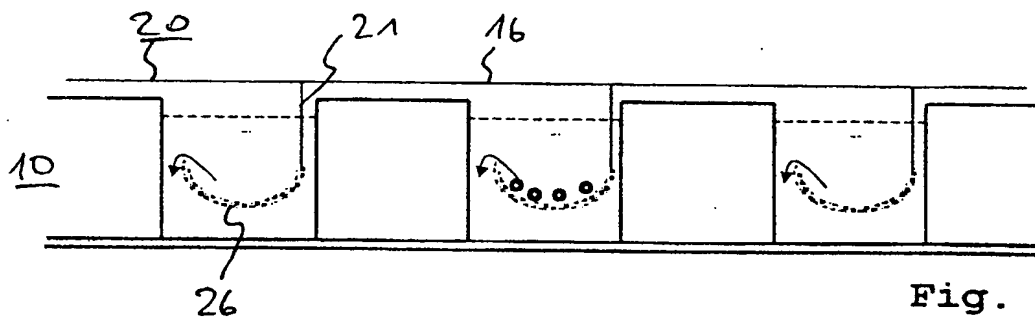


Fig. 8

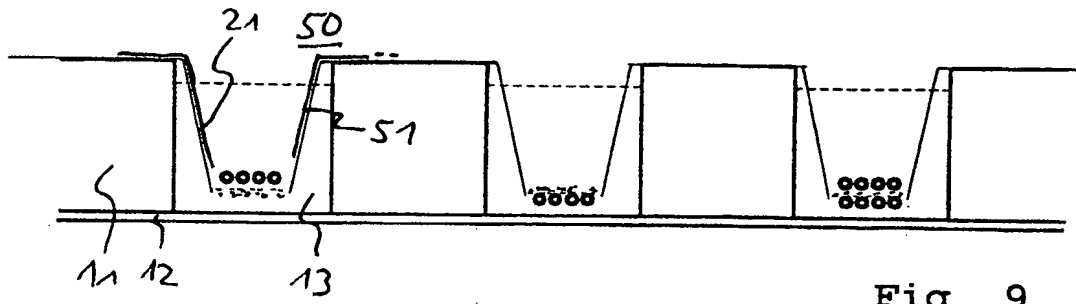


Fig. 9

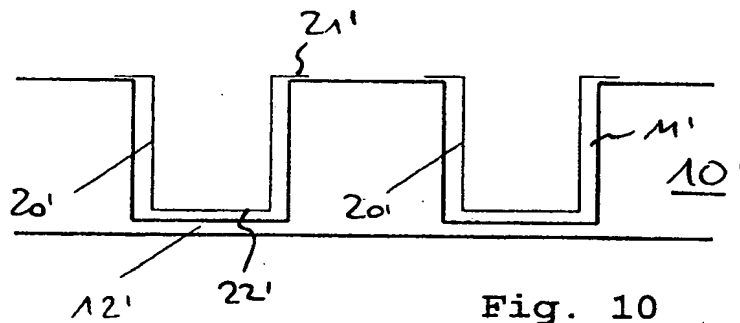


Fig. 10
(Stand der
Technik)

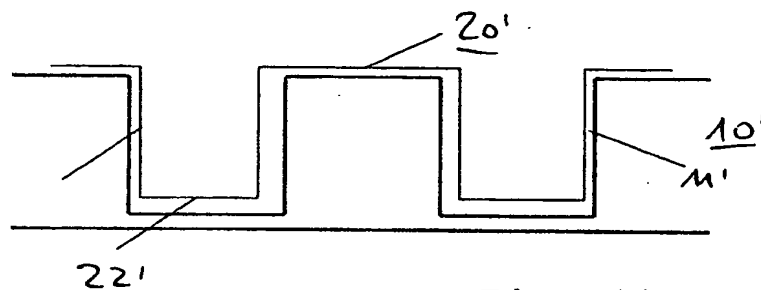


Fig. 11
(Stand der
Technik)

BEST AVAILABLE COPY